Lane Medical Library

Aus der Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses am Urban,
Berlin. Direktor Prof. Dr. Juergens.

Ein Beitrag zur Reversibilität der Dehydrierung von Sulfhydrylkörpern

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Berlin

vorgelegt von

Martin Kalinke

aus Königshütte (Oberschlesien)

Tag der Promotion: 15. II. 1935.

1935

Dissertationsdruckerei und Verlag Konrad Triltsch, Würzburg.

188

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Berlin.

Dekan:
Prof. Dr. Magnus.

Referent:
Priv.-Doz. Dr. H. W. Bansi.

Korreferent:
Prof. Dr. Siebeck.

I. Allgemeines über das Glutathion.
   a.) seine Chemie.
   b.) sein Vorkommen.
   c.) seine biologische Bedeutung.

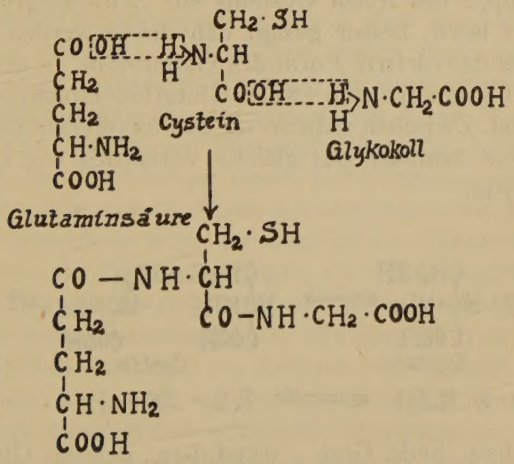
II. Das Glutathion des Blutes.
   a.) Abhängigkeit von der Sauerstoffspannung.
   b.) der „reversible Anteil" des Glutathions.

III. Modellversuche.
   a.) Cystein.
   b.) Glutathion.

IV. Methodik.
   a.) Cysteinbestimmung.
   b.) Glutathionbestimmung.

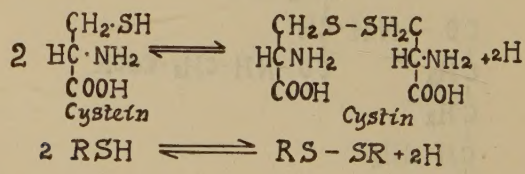
Zusammenfassung.

Bereits de Ray-Pailhade 1) hat im Jahre 1888 auf schwefelhaltige, reduzierend wirkende Substanzen (Philothion) hingewiesen, welche er in tierischen Geweben antraf, und welche er mit den biologischen Oxydationen in Zusammenhang brachte. Jedoch erst 20 Jahre später verhalf A. Hefter 2) diesen Arbeiten zu der ihnen bis dahin versagten, gebührenden Anerkennung. Er wies nach, daß der „hydrogène philothionique" der Wasserstoff einer Thiolgruppe (R—SH, Merkaptan) sein müsse und bezeichnete das Cystein als das Modell eines „reduzierenden Fermentes". Einen mächtigen Impuls erhielt das Problem der chemischen Charakterisierung von bis dahin als Fermentreaktion angesehenen Oxydoreduktionsprozessen durch die Arbeiten von Hopkins 3), in denen er von der Entdeckung des Glutathions berichtet. Um die Aufklärung der chemischen Struktur machten sich außer Hopkins vor allem Hunter und Eagles 4) verdient. Anfangs glaubten Hopkins und mit ihm zahlreiche andere Forscher, es handele sich um ein Dipeptid, bestehend aus Cystein und Glutaminsäure. Man hatte es auch aus diesen beiden Aminosäuren synthetisch hergestellt und meinte, die obige Ansicht dadurch bestätigt zu haben. Hunter und Eagles haben als erste die Behauptung aufgestellt, daß es sich beim Glutathion um ein Tripeptid handele, dessen dritte Aminosäure das Glykokoll sei. 1929 traten Hopkins 3) und Kendall 5) dieser Ansicht bei. Das Glutathion hat nach dem Stande der heutigen Forschung folgende Strukturformel:



Glutathion
(γ-Glutaminyl--Cysteinyl-Glycin).

Die Frage nach der Gestalt der Konstitutionsformel des Glutathion berührt Graßmann 6) in seiner Arbeit über die enzymatische Spaltung des Gutathions. Daraus ergibt sich: das Glykokoll steht keinesfalls in der Mitte der Peptidkette, sondern an einem ihrer freien Enden. Und zwar muß es mit seiner COOH-Gruppe frei, mit seiner NH_2-Gruppe aber peptidartig verknüpft sein; denn die Carboxy-Polypeptidase vermag nach vielfachen Erfahrungen nur solche Aminosäurereste abzuspalten, deren Carboxyl unbesetzt ist. Auch ist bereits festgestellt, daß die freie Aminogruppe des Glutathions der Glutaminsäure angehört (Kendall und Mitarbeiter 7). Da außerdem die Isolierung des Glycyl-Cystinanhydrids durch Hopkins auf eine unmittelbare Verknüpfung zwischen Glykokoll und Cystin hinweist, muß die Formel des Glutathions die eines Glutaminyl-cysteinyl-glycins sein. Die Frage, welche der beiden Carboxylgruppen der Glutaminsäure an der Peptidbindung beteiligt ist, beantwortet Graßmann dahingehend, daß es sich hierbei um die Carboxylgruppe handele, welche der freien Aminogruppe nicht benachbart ist; denn nur diese Anordnung biete eine befriedigende Erklärung für die Widerstandsfähigkeit des Tripeptids gegenüber Aminopolypeptidase. Dieser Verknüpfung der drei Aminosäuren kommt insofern eine große Bedeutung zu, als sie die Beständigkeit des Glutathions gegen proteolytische Enzyme weitgehend sichert. Glutathion ist nämlich eines der wenigen natürlich resistenten Tripeptide, die bisher aus Eiweißspaltgemischen isoliert werden konnten. Nach Hopkins Angaben läßt sich das Glutathion aus Hefe kristallinisch rein darstellen. Es hat einen scharfen Schmelzpunkt bei 190° C und ein Aequivalentgewicht von 307,25. Ebenso wie die Sulfhydrylgruppe des freien Cysteins zur Schwefelgruppe des Cystins oxydiert bezw. besser gesagt dehydriert werden kann, kennt man auch eine dehydrierte Form des Glutathions, in der die Schwefelatome der Cysteingruppen zweier Glutathionmoleküle miteinander verbunden sind. Zwischen reduzierter und oxydierter Form des Glutathions besteht demnach das gleiche Verhältnis wie zwischen Cystein und Cystin.



red. bzw. hydr. Glut. oxyd. bzw. dehydr. Glut.

R = Abkürzung des an der Thiolgruppe hängenden Restes des Glutathionmoleküls.

Die Oxydation des Glutathions ist nach Hopkins in weitgehendem Maße von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig, und zwar tendiert das Gleichgewicht zwischen SS und SH bei alkalischer Reaktion nach SS und bei saurer nach SH.

$$2RSH \underset{sauer}{\overset{alkalisch}{\rightleftharpoons}} RS\text{-}SR + 2H$$

Das Glutathion ist eine Substanz, die in der belebten Natur allgemein anzutreffen ist. Fast alle tierischen und pflanzlichen Zellen enthalten mehr oder weniger große Mengen. Vergleichende Untersuchungen an Pflanzen ergaben, daß Gewebe mit lebhaftem Längenwachstum, z. B. die Vegetationspunkte, oder Gebiete mit lebhaftem Kohlehydratstoffwechsel, z. B. die chlorophyllreichen Zonen auch einen erhöhten Glutathiongehalt aufweisen. Die gleiche Proportion treffen wir im tierischen Organismus an. Drüsen mit sehr lebhaftem Stoffwechsel zeichnen sich auch durch hohen Glutathiongehalt aus, z. B. die Leber. Nach Kamiya Tokuo 8) sind die Organe bezüglich ihres Glutathiongehaltes in absteigender Reihe folgendermaßen einzuordnen: Leber, Testes, Lunge, Pankreas, Uterus, Herz, Muskel, Blut. Auch innerhalb der Organe selbst differiert der Glutathiongehalt. So sind z. B. in der Leber einige Bezirke besonders glutathionreich, was zu der Annahme berechtigt, daß in diesen Zonen ein besonders lebhafter Stoffwechsel vor sich geht. Beim Nervensystem ist das Zentralorgan am glutathionreichsten und dort wiederum die graue Substanz reicher als die weiße.

Bei einer ganzen Reihe von biologischen Problemen (Oxydations-, Atmungstheorien, Aktivierung proteolytischer Fermente / Kinasen / Entgiftungsprozessen u. a. m.) wird dem Glutathion ein entscheidender Einfluß zugeschrieben. Seine Bedeutung soll darin liegen, daß es sich reversibel, innerhalb der intra vitam vorkommenden P_H Verschiebungen aus der reduzierten Form in die oxydierte verwandeln und hierbei als Wasserstoffdonator bezw. -akzeptor wirken kann. Die Hydrierung bezw. Dehydrierung erfolgt in den Geweben aber nicht nur im Maße des stoechiometrisch verfügbaren Wassertoff; denn dann wäre der Einfluß des Glutathions auf die Oxydationsprozesse nur ein geringer, da der Glutathiongehalt nur gering ist. Vielmehr überträgt es auf Wasserstoffakzeptoren, wie Methylenblau oder Sauerstoff, den Wasserstoff von leicht dehydrierbaren Stoffen, wie sie im Zellsafte vorhanden sind, in viel größerem Maße, als es die stoechiometrische Gleichung erwarten läßt, sodaß auf diese Weise erhebliche Oxydationen im Sinne der Wieland'schen Dehydrierungstheorie möglich sind. Eine weitere bedeutungsvolle Aufgabe erfüllt das Glutathion bei der Aktivierung der Fermente, da ja den fermentativen Einflüssen bei Oxydoreduk-

tionsprozessen in den Zellen eine große Bedeutung zukommt. So ist z. B. das „reduzierte" Glutathion mit der Zookinase identisch und vermag als solche das gelatinespaltende Ferment Kathepsin zu aktivieren (Abderhalden 9), während das „oxydierte" Glutathion nach Pringsheim 10) auf das stärkespaltende Ferment Amylolase spezifisch aktivierend wirkt. Beachtlich ist die Tatsache, daß sowohl die SS-Form, wie auch die SH-Form je eine fermentative Spaltung spezifisch einzuleiten imstande ist.

Für die Synthese des Glutathions im Organismus kommt nach Blanchetière 11) die Nebenniere in Betracht. Bei Untersuchungen der menschlichen Haut (A. Giroud 12) hat sich ergeben, daß der Glutathiongehalt mit dem Fortschreiten der Keratinisation abnimmt. Diese Tatsache läßt den Schluß zu, daß das Glutathion die Muttersubstanz für die S-haltigen Gruppen des Keratins ist. Ferner kommt dem Glutathion eine antitoxische Komponente (Voegtlin 13) zu. Im Rattenversuche wurden sonst sicher tödlich wirkende As_2O_3 Dosen durch Injektion von Glutathion entgiftet. In vitro werden Trypanosomen vor der Giftwirkung des As_2O_3 ebenfalls durch Glutathion geschützt, ja sie behalten sogar ihre hohe Infektiosität. Auch Beziehungen zu den Drüsen mit innerer Sekretion werden angenommen (Takuwa Manao 14). So vermag Insulin, Thyreoidin und Ephedrin den Glutathionspiegel im Blute zu senken, während er durch Adrenalin, Pituitrin und Traubenzucker erhöht werden kann.

Im Blut ist das Glutathion an die globulären Elemente gebunden, während das Plasma völlig frei davon ist. Die Leukozyten enthalten mehr Glutathion als die Erythrozyten, eine Tatsache, die verständlich wird, wenn man die lebhaften Oxydationsprozesse der Leukozyten dem geringen Stoffumsatz der Erythrozyten gegenüberstellt. Bei den Untersuchungen des Blutes auf seinen Glutationgehalt kann man jedoch die Leukozyten vernachlässigen und praktisch vom Glutathionsgehalt der roten Blutzellen sprechen; denn der Anteil der Leukozyten an den Blutzellen übersteigt ja nur selten 2‰. Hunter und Eagles haben etwa 100 mg% Glutathion in den roten Blutzellen gefunden. Weil sich die SH-Verbindungen, wie oben erwähnt, in den Erythrozyten befinden, schwankt der Glutathiongehalt der Blutflüssigkeit notwendigerweise mit der in ihr enthaltenen Anzahl der Erythrozyten. Gabbe 15) hat daher in Analogie zur Berechnung des Färbeindex beim Hämoglobin einen Glutathionquotienten dadurch gebildet, daß er den im Blute gefundenen Glutathiongehalt zur Menge der Erythrozyten in Beziehung setzte. Hierbei zeigte sich, daß es rote Blutkörperchen gibt, die besonders glutathionreich sind. Während sich die normalen Glutathionquotienten zwischen 5,8 und 9,3 bewegten, stieg er z. B. bei

Anaemien auf 16,3 an. Ferner fand Gabbe bei seinen Untersuchungen über die Bedeutung des Glutathions der roten Blutkörperchen, daß der Gehalt an RSH in der Vene höher als in der Arterie ist, und daß der Unterschied im Mittel um 17,3% schwankt. Hieraus zieht er den Schluß, daß das Glutathion im Lungenkreislauf seinen Wasserstoff an den Luftsauerstoff abzugeben imstande sein muß, bzw., daß es auf dem Wege linkes Herz — Kapillaren — rechtes Herz aus dem Gewebe Wasserstoff aufzunehmen vermag. Das Glutathion erfüllt hiermit eine Aufgabe, durch welche es bei der Sauerstoffübertragung zwischen Lunge und Gewebe dem Hämoglobin an die Seite gestellt werden kann. Gabbes Berechnung über den quantitativen Anteil des Glutathions am Gesamtsauerstoffverbrauch des Menschen ergibt, daß durch den Glutathiongehalt der roten Blutkörperchen etwa $^1/_{10}$ bis $^1/_6$ des Gesamtsauerstoffverbrauches, wie er im respiratorischen Gaswechsel zum Ausdruck kommt, vermittelt werden könnte. Für die Hydrierung des Glutathions im Blute konnte Gabbe neben dem Vorhandensein von H-Donatoren noch zwei Bedingungen aufstellen:

1.) Eine Säuerung des Blutes,

2.) Eine teilweise Reduktion des Oxyhämoglobins.

Durch Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes in der Inspirationsluft konnte er den Glutathiongehalt des Blutes beim Kaninchen innerhalb von 2—4 Stunden um 30—44% des Ausgangswertes erhöhen. Ebenso stieg der Glutathiongehalt des menschlichen Blutes bei ähnlichen Versuchen in der pneumatischen Kammer. Es scheint hiernach die Erhöhung des Glutathiongehaltes im Blute eine Anpassung an ungünstige Sauerstoffverhältnisse zu sein. Hierdurch finden die Experimente von Blanchetière 16) ihre Bestätigung, welche dieser bereits 1927 an Hunden ausgeführt hatte. Durch künstliche Asphyxie (Kompression der Trachea) konnte er den Gehalt an reduziertem Glutathion in den Arterien ganz erheblich erhöhen, während er durch künstliche Hyperventilation den Gehalt in der Vene nicht wesentlich vermindern konnte. Auch Anselmino 17) nahm zu dieser Frage Stellung und trat der Auffassung Gabbes bei; denn er stellte fest, daß das Blut der Frucht in utero mehr SH-Glutathion enthält, als das mütterliche Blut. Zu ähnlichen diese Theorie stützenden Ergebnissen kamen jüngst Debrue, G. u. A. Fischer 18). Sie konnten bei Höhenaufenthalt ein Ansteigen des Glutathiongehaltes im Blute feststellen. Dieser Anstieg ging weit hinaus über den Wert, der sich theoretisch aus der Zunahme der Erythrozyten erwarten ließ.

Bekanntlich besteht zwischen dem Sauerstoffbindungsvermögen des Hämoglobins und der Sauerstoffspannung (= Sauerstoffpartialdruck) eine gesetzmäßige Beziehung. Da nun der Glutathiongehalt

in der Vene ein anderer ist als in der Arterie, lag es nahe, sich die Frage vorzulegen, ob für das Glutathion des Blutes im Atemzyklus ebenfalls eine Abhängigkeit von der Sauerstoffspannung besteht. Es war also zu klären, ob eine Erhöhung des Partialdruckes eine Oxydation des Glutathion und seine Verminderung eine Reduktion bewirkt. Wir gingen bei unserer Versuchsanordnung wie bei der Bestimmung einer Sauerstoffdissoziationskurve des Blutes (Barcroft) vor. Frisches defibriniertes Hammelblut wurde im Tonometer mit verschiedenen Gasgemischen gesättigt. Die Gasgemische, je 10 l, wurden in einem Spirometer aus Kohlensäure, Sauerstoff und Stickstoff hergestellt, wobei wir die Kohlensäurespannung auf einem konstanten Wert hielten, die Sauerstoffspannung aber langsam ansteigen ließen. Das so gesättigte Blut wurde im Wasserbade auf eine Temperatur von 37° gebracht, wobei der Gasdruck im Tonometer mit dem Atmosphärendruck ausgeglichen wurde. Die Partialdrucke der Kohlensäure und des Sauerstoffs wurden im Haldaneschen Gasanalysenapparat ermittelt. Im Folgenden seien einige Beispiele angeführt:

Kurve zu Tab. I.

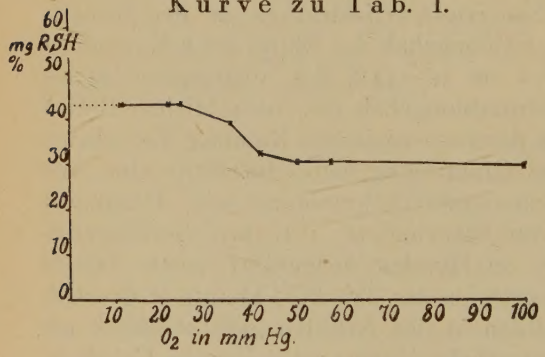


Tabelle I.

CO_2 mm Hg	O_2 mm Hg	RSH	$\frac{RSH}{(RSH)_R}$
44	12,0	43	100
	23,6	43	100
	25,0	43	100
	36,4	38,9	95
↓	42,75	32,7	76
konst.	50,0	30,7	70
	58,5	30,7	70
	100,0	28,6	66,5

Kurve zu Tab. II.

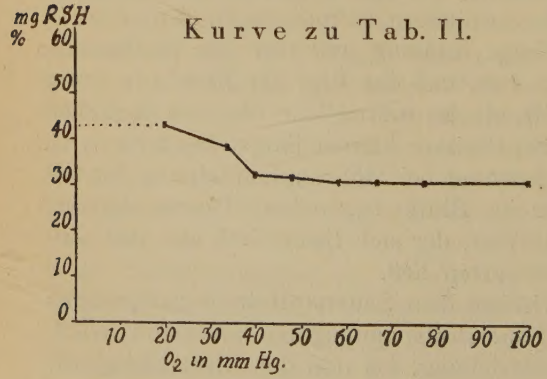


Tabelle II.

CO_2 mm Hg	O_2 mm Hg	RSH	$\frac{RSH}{(RSH)_R}$
40	20,0	43	100
	33,8	38,98	90,5
	40,0	32,7	76,0
	47,6	32,0	74,0
↓	58,3	31,5	73,2
konst.	66,2	31,5	73,2
	77,2	31,5	73,2
	100,0	31,5	73,2

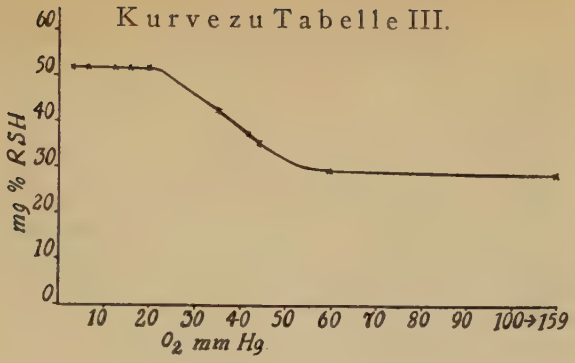


Tabelle III.

CO_2 mm Hg	O_2 mm Hg	RSH	$\frac{RSH}{(RSH)_R}$
42	3,3	52,25	100
	6,2	52,25	100
	12,4	52,25	100
	15,6	52,25	100
	20,0	52,25	100
	35,0	43,5	83,4
	42,6	37,9	72,6
konst.	44,3	35,7	68,3
	59,2	29,5	58,4
	159,0	28,6	56,7

Tabelle IV.

CO_2 mm Hg	O_2 mm Hg	RSH
40	3,2	33,80
	6,4	34,50
	6,8	34,50
	9,3	34,50
konst.	10,3	33,80
	11,5	34,40
	21,5	33,80

Aus den Tabellen I—III und den dazugehörigen Kurven ist ersichtlich, daß die Sauerstoffspannung bei der Dehydrierung des Glutathions einen sehr wesentlichen Faktor darstellt. Und zwar ist es ein ganz eng begrenzter Spannungsbereich, in welchem die Umwandlung des Glutathions aus der SH-Form in die SS-Form vorsichgeht, wie die Kurven besonders deutlich veranschaulichen. Während ein Ansteigen der Sauerstoffspannung von 0 bis ca. 25 mm Hg den Glutathionbestand des Blutes völlig unbeeinflußt läßt, — siehe im besonderen auch Tabelle IV, welche die RSH-Werte in niedriger Sauerstoffspannung enthält — beginnt über 25 mm Hg Sauerstoffspannung die Dehydrierung rapide, um bei 50 mm Hg bereits ihren Höhepunkt erreicht zu haben. Eine Steigerung der Sauerstoffspannung über 50 mm Hg vermag auf den jetzt noch im Blute vorhandenen RSH-Bestand nicht mehr dehydrierend zu wirken. Durch Verminderung der Sauerstoffspannung ließ sich das bereits dehydrierte Glutathion wieder in die hydrierte Form überführen, eine Bestätigung für die Annahme, daß es sich um einen reversiblen Prozeß handelt. Unsere Befunde stimmen mit den Arbeiten von Litarczek 19) überein.

Litarczek hatte folgende Ergebnisse:

Kurve zu Tab. V.

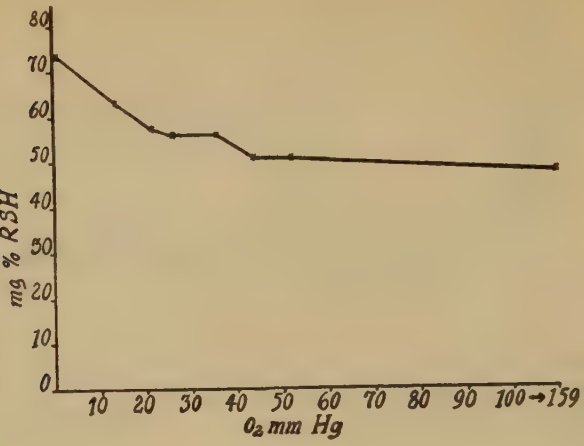


Tabelle V.

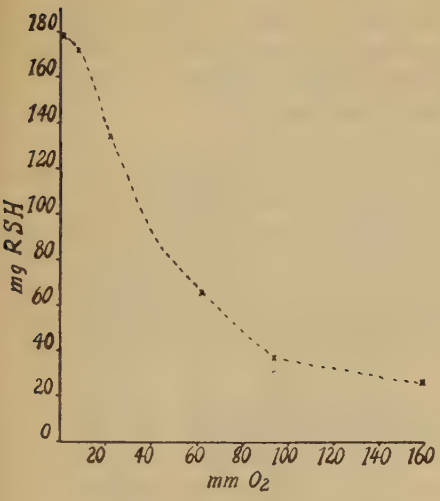
CO_2 mm Hg	O_2 mm Hg	RSH	Sättigung i.%
-	0	74	100 nasz.H_2
39	13,4	63,0	85
↓	22,4	57,0	77
konst.	26,4	56,5	76,4
	36,0	56,3	76,1
	43,7	50,3	68
	52,0	51,0	68,9
	159,0	43,7	63,5 Außenl.

Hiernach ist die Sauerstoffspannung von 45—50 mm Hg auch bereits ausreichend, um den Glutathionbestand des Blutes bis zu einem Endpunkt zu oxydieren. Der verbleibende restliche Glutathionbestand ist durch eine Erhöhung der Sauerstoffspannung im Sinne einer Oxydation nicht mehr zu beeinflussen.

In Analogie zur prozentualen Sauerstoffsättigung des Hämoglobins wurde ein Quotient aus dem bei bestimmter Sauerstoffspannung gefundenen Glutathionwert = RSH und dem sich bei völliger Reduktion ergebenden Werte = (RSH)R gebildet. Die Werte, welche in der vierten Kolumne der Tabellen I—III eingetragen sind, schwanken bei mehr als 50 mm Sauerstoffspannung zwischen 56 und 73. Diese Zahlen, welche Litarczek die prozentuale Sättigung des Glutathions nennt, sind sehr variabel, weil sie von der Größe der reversiblen Glutathionanteile und dem Gesamtglutathiongehalt weitgehend abhängig sind.

Um die Oxydation des Glutathions bei Abwesenheit von Erythrozyten zu beobachten, trug Litarczek reduziertes Glutathion in

Serum ein und bestimmte den RSH-Gehalt unter wechselnder Sauerstoffspannung. Durch folgende Tabelle mit Kurve wird die Abhängigkeit des RSH-Gehaltes von der Sauerstoffspannung veranschaulicht.



RSH in Serum gelöst.

CO_2 mm Hg	O_2 mm Hg	RSH	Sättigung i.%
-	0	178	100 nasz.H_2
42	8,7	171,5	96
↓	22,0	134,0	75
	61,3	66,3	37
konst.	94,0	37,8	21
	160,0	28,7	16

Bei diesem Versuch gelang es Litarczek das Glutathion in viel weitgehenderem Maße zu dehydrieren. Die prozentuale Sättigung ging bis auf 16 herunter.

Für die Beurteilung und das bessere Verständnis der Aufgaben, welche das Glutathion als Oxydoreduktionssystem an der Seite des Hämoglobins im Organismus zu erfüllen scheint, ist die Tatsache, daß die Oxydation bezw. Reduktion des Glutathions nur bis zu einem gewissen Grade erfolgt, sehr bemerkenswert. Der Glutathionbestand des Blutes zerfällt anscheinend in zwei Anteile. Der eine größere Anteil bleibt von den Veränderungen des Blutes im Atemzyklus unbeeinflußt und dürfte eben wegen seiner Unveränderlichkeit keine oxydationsfördernde Wirkung besitzen. Anders verhält sich dagegen der zweite kleinere Anteil. Dieser beteiligt sich lebhaft an den Schwankungen des Oxyhämoglobins und zeigt die oben erwähnte hohe Empfindlichkeit gegenüber der Sauerstoffspannung im Bereich von 25—50 mm Hg, also in einem Spannungsbereich, wie wir ihn für die Gasdruckverhältnisse im atmenden Gewebe als gegeben annehmen müssen. Diesen Anteil nenne ich, weil er mir der für die biologischen Prozesse allein wichtige zu sein scheint, den „reversiblen" Anteil im Gegensatz zu dem zweiten, „irreversiblen" Anteil. Der Gesamtglutathiongehalt des Blutes zeigt, wie ich an zahlreichen Bestimmungen feststellen

konnte, erhebliche individuelle Schwankungen. Das Gleiche gilt auch für den reversiblen und irreversiblen Anteil. Aus den oben entwickelten Gedankengängen über die verschiedene Bewertung der beiden Glutathionanteile ergab sich folgende Fragestellung:

Wie groß ist der reversible Anteil des Blutglutathions bei den einzelnen Krankheitsprozessen des menschlichen Organismus und besteht eine kausale Beziehung zwischen den einzelnen Befunden.

Die Untersuchung einer größeren Anzahl klinischer Fälle unter diesem Gesichtspunkte brachte folgendes Ergebnis.

Name	Krankheit	RSH im art. Blut	Gesamt-RSH	Differenz in: mg.	%
Herr Sa.	gesund	29,0	37,0	8,0	21,6
" Ba.	"	27,5	35,8	7,3	22,5
" Ka.	"	29,7	38,9	9,2	23,6
" Ro.	"	29,0	37,0	8,0	21,6
" Mo.	"	29,7	37,4	7,7	20,6
Frau Sch.	Ikterus	23,60	29,70	6,1	20,5
" K.	Uraemie	22,50	29,70	7,2	24,0
" D.	chron. Arthritis	28,32	35,80	7,48	20,45
" Re.	Adnexitis	32,80	39,00	6,2	16,0
" M.	Unterl. Geschwulst	41,64	50,23	8,59	17,0
" R.	Diabetes	36,36	55,68	19,32	33,9
Herr O.	Basedow	23,45	39,47	16,02	40,6
Frau Bo.	"	19,40	33,80	14,4	42,5
" Blo.	"	15,30	33,70	18,4	54,5
" Lin.	"	20,50	36,90	16,4	44,5
" S.	"	26,60	33,80	7,2	21,3
" Frö.	" u. Herzdekomp.	22,50	41,50	19,0	46,3
Frau Da.	Herzdekompensat.	33,60	48,90	15,3	31,30
" Behr.	Myodegeneratio	30,70	54,20	23,5	42,5
Herr Oh.	Aortenins uff. Dek.	30,70	51,20	20,5	39,3
" Kai	Pulm. Herzinsuff. u. Anaemie	12,30	27,60	15,3	55,2
Frau Schw.	Cyanose, Lungenstauung	33,60	57,00	23,4	43,25
" La.	Hypertonie	16,39	28,60	12,21	42,5
" Lo.	"	42,00	62,50	20,5	33,6
" Li.	Grippe	42,90	67,00	24,1	37,3
" Bu.	Pneumonie	22,50	29,70	7,2	24,0
" Hö.	Co-Vergiftung	19,38	34,00	14,62	43,0
" Me.	Co-Vergiftung	32,70	55,20	22,5	40,8

Aus der Tabelle geht hervor, daß der gesunde Mensch — die Bestimmungen wurden an kräftigen, jungen Individuen gemacht — über einen reversiblen Anteil von annähernd konstant 20% des Gesamtglutathions verfügt. Der absolute Wert beträgt etwa 5—10 mg %. Werte in etwa der gleichen Höhe ergab die Untersuchung von Patienten, deren Krankheitsprozesse keine erhöhten Anforderungen an die Versorgung der Peripherie des Organismus mit Sauerstoff stellten z. B. Ikterus, Adnexitis, chronische Arthritis u. a. m.

Eine wesentliche Erhöhung des reversiblen Anteils ergab sich ganz generell bei sogenannten Sauerstoffmangelkrankheiten, wie sie uns z. B. bei der Thyreotoxikose, der Kreislaufinsuffizienz und auch der Leuchtgasvergiftung entgegentreten. Während beim Basedow der Sauerstoffmangel bedingt ist durch die lebhaft gesteigerten Oxydationsvorgänge im Organismus, ist z. B. bei einer Myodegeneratio cordis mit Dekompensationserscheinungen die verlang-

samte Zirkulation mit der dadurch bedingten vermehrten Abschöpfung des Sauerstoffs die Ursache für den Sauerstoffmangel an der Peripherie. Bei Leuchtgasvergiftung ist der Sauerstoffhunger dadurch bedingt, daß ein sehr großer Teil des Hämoglobins durch die feste Bindung an das Kohlenoxyd vom Sauerstofftransport ausgeschaltet ist. So konnte ich teilweise einen Anstieg des reversiblen Anteils auf über 50% des Gesamtglutathiongehaltes feststellen. Der absolute Wert des reversiblen Anteils stieg stellenweise über 20 mg %. Die Befunde bestätigen die Annahme, daß das Glutathion als Oxydoreduktionssystem bei den Oxydationsprozessen des Körpers einen wesentlichen Faktor darstellt; denn in der Mehrzahl der Fälle stand dem Organismus bei den erwähnten Sauerstoffmangelkrankheiten eine beträchtlich größere Menge an reversiblen Glutathion zur Verfügung, auf welches von ihm nötigenfalls als Reserve zurückgegriffen werden könnte. Hiernach ist die Vermehrung des reversiblen Anteils als eine zweckmäßige, kompensatorische Regulation des menschlichen Organismus aufzufassen.

Modellversuche.

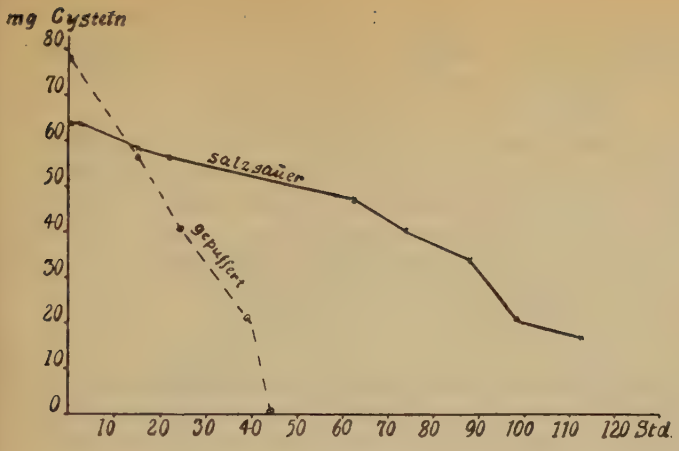
Da das Cystein der wesentlichste Bestandteil des Glutathions ist (s. o.) und nach O. Warburg das Cystein-Cystinsystem als ein Atmungsmodell angesehen werden kann, lag es nahe, das Verhalten des Cysteins zur Sauerstoffspannung in einem Modellversuche nachzuprüfen. Es ergaben sich folgende Fragen: läßt sich der SH-Gehalt einer, den physiologischen Bedingungen möglichst angepaßten Cysteinchloridlösung (Pufferung und Temperatur) bei steigenden Sauerstoffspannungen im Sinne einer Oxydation verändern und läßt sich dieser Prozeß durch Verminderung der Sauerstoffspannung umkehren? Ferner sollte geprüft werden, ob durch Zusatz minimaler Mengen ionisierten bzw. komplexgebundenen Eisens (Fe ' ', Fe ' ' ', Hb und Serum) im Sinne Warburgs eine Beschleunigung der Reaktion eintreten würde.

Dieser Modellversuch wurde unter folgenden Bedingungen ausgeführt. Eine eisenfreie Cysteinchlorhydratlösung von annähernd gleichem SH-Gehalt wie das menschliche Blut, wurde mit den von Warburg für die Cysteineisenkatalyse angegebenen Pyrophosphatpuffer versetzt und im Tonometer unter wechselnden Sauerstoffdrucken gedreht. Hierauf wurde das Tonometer 15 Min. bei 37° C im Wasserbade bewegt und hierbei der Gasdruck gegen die Atmos-

phäre ausgeglichen. Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurde das Verhalten des Cysteins nach Zusatz von Katalysatoren beobachtet. Es ergeben sich folgende Resultate:

	bei Außenluft		b. reinem O_2
1. Versuch	SH-Gehalt in mg ohne Katalysator	0,71	0,75
2. Versuch	SH-Gehalt in mg nach Zusatz von Fe$^{\cdot\cdot}$	0,65	0,62
3. Versuch	SH-Gehalt in mg nach Zusatz von Fe$^{\cdot\cdot\cdot}$	0,77	0,75
4. Versuch	SH-Gehalt in mg nach Zusatz v. Serum	0,56	0,59
5. Versuch	SH-Gehalt in mg nach Zusatz v. Hb-Prap. Kahlb. Scher.	0,41	0,37

Die Sauerstoffspannung ist der Tabelle zufolge ohne Einfluß auf den SH-Gehalt der Cysteinlösung geblieben. Die bei dem Zusatz von Fe$^{\cdot\cdot}$ und Hämoglobin scheinbar gefundenen Schwankungen müssen als innerhalb der Fehlergrenze betrachtet werden. Die vorstehenden Ergebnisse wurden mit kurz vor Beginn des Versuches frisch hergestellten Lösungen erzielt. Es ist wichtig, dieses hervorzuheben, da die Autoxydation des Cysteins bei längerem Stehen an der Luft bekannt ist. Wurde eine 24 Std. alte Cysteinlösung unter denselben Versuchsbedingungen untersucht, so gelang es leicht den SH-Rest der Lösung durch Außenluft, ja sogar durch Stickstoff, der nur Spuren von Sauerstoff enthält, zur SS-Form zu oxydieren. Eine Umkehr des Oxydationsprozesses, d. h. eine Reduktion der gebildeten SS-Form, war nicht zu erreichen. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine kontrollierbare Abhängigkeit der Cysteinlösung von der Sauerstoffspannung unter den angegebenen Bedingungen und einer zeitlich auf 15 Min. beschränkten Einwirkungsdauer im Gegensatz zum Glutathion nicht festzustellen war, eine Erscheinung, die möglicherweise mit der verschiedenen Molekülgröße in Zusammenhang steht. Hingegen ließ sich eine deutliche Empfindlichkeit der Cysteinchlorhydratlösung gegenüber der Wasserstoffionenkonzentration nachweisen; denn die Autoxydation einer gepufferten Cysteinlösung verlief wie aus nachfolgender Tabelle mit Kurve ersichtlich bedeutend beschleunigt.



salzsauer

Zeit Std.	SH-Gehalt i. mg %
0	60,3
3	60,3
15	58,4
22	56,5
63	47,1
74	41,5
89	34,9
98	22,6
113	18,8

gepuffert

Zeit Std.	SH-Gehalt i. mg %
0	77,2
15	56,5
24	41,4
39	22,6
44	0,0

Dieselbe Empfindlichkeit gegenüber der Wasserstoffionenkonzentration konnte ich durch einen zweiten Modellversuch auch für das Glutathion gültig belegen:

Etwa 100 ccm Blut wurden durch Zusatz von 30%iger Trichloressigsäure enteiweißt und die Koagula durch Filtrieren entfernt. Das Filtrat stellte eine Glutathionlösung dar, deren SH-Gehalt sich durch Titration feststellen ließ. Wurde nun diese Lösung durch Zusatz von Kalilauge neutralisiert, und mit Pyrophosphatpuffer gepuffert, so vollzog sich die Oxydation des Glutathions an der Außenluft momentan. Es ließ sich jetzt durch Titration kein SH-Körper in der Lösung nachweisen. Auch durch Verminderung des Sauerstoffpartialdruckes über dieser gepufferten Lösung ließ sich kein SH-Körper zurückgewinnen. Es handelte sich also in diesem Falle bei der Oxydation des Glutathions um einen irreversiblen Vorgang. Erwähnen möchte ich noch, daß sich in meiner nach der obigen Vorschrift hergestellten Glutathionlösung durch Rhodankalium Eisen nachweisen ließ, das aus dem Blute stammte und evtl. die obige Reaktion katalysiert haben könnte.

Methoden der Cystein- und Glutathionbestimmung.

Cysteinbestimmung.

Y. Okuda 20) machte ausführliche Angaben über eine Cysteinbestimmung mittels Brom und Jod, ausgehend von der Annahme, daß sich das Cystein durch die genannten Oxydationsmittel bis zur Sulfosäure oxydieren ließe.

$$\begin{array}{l} CH_2 \cdot SH \\ | \\ HC \cdot NH_2 \\ | \\ COOH \end{array} + 6Br + 3H_2O = \begin{array}{l} CH_2 \cdot SO_3H \\ | \\ HC \cdot NH_2 \\ | \\ COOH \end{array} + 6HBr$$

Bei der Verwendung von Jod entstünden erhebliche Schwierigkeiten. Die Werte müßten nach einem empirischen Faktor berechnet werden. Die Temperatur sei stets sofort nach der Titration zu ermitteln, da diese eine wesentliche Korrektur bedinge.

Bei meinen methodischen Vorversuchen konnte ich gemeinsam mit Rohrlich nachweisen, daß das Cystein durch Jod stoechiometrischen Verhältnissen folgend nur bis zur Disulfidform oxydiert wird. Die Titration erfolgte in salzsaurer Lösung. Das Jod wurde intermediär aus HJ und HJO_3 nach folgender Gleichung entwickelt:

$$HJO_3 + 6HJ = 6J + HJ + 3H_2O$$

Versuch: 37,6 mg bzw. 86,2 mg Cysteinchlorhydrat wurden in einem Meßkolben in 100 ccm dest. Wasser aufgelöst. 10 ccm dieser Lösung wurden mit 5 ccm 4%iger Salzsäure, 5 ccm 5%iger Jodkalilösung und 2 Tropfen 3%iger Stärkelösung versetzt. Titriert wurde mit $\frac{n}{100}$ KJO_3-Lösung bis zu einem beständigen blauen Farbton. Es wurden gefunden:

	gegeben mg%	gefunden mg%
mg. Cystein-chlorid	37,6	35,8 37,6
mg. Cystein-chlorid	86,2	87,5 86,3

Da nach obiger Gleichung aus einem Mol.HJO_3 6 Mol.J für die Oxydation des RSH verfügbar werden, ergibt sich folgende zahlenmäßige Beziehung

$$6\ RSH + HJO_3 = 3\ RS — SR + HJ + 3H_2O$$

$$1\ ccm\ \frac{n}{100}\ KJO_3\ Lösung = 6 \times 1{,}57 = 9{,}42\ mg.$$

Glutathionbestimmung.

Ihrem Prinzip nach kann man die quantitativen Bestimmungsmethoden des Glutathions in drei Gruppen einteilen:

1.) Colorimetrische Methode
2.) Gasvolumetrische Methode
3.) Jodmetrische Titration.

Zur ersten Kategorie zählt die von Folin und Loony 21) angegebene und später von Hunter und Eagles 22) modifizierte Methode. Sie beruht auf der Blaufärbung des Glutathions in alkalischer Lösung von Phosphorwolframsäure in Gegenwart von Natriumsulfit. Die zweite Gruppe beruht auf der quantitativen Schwefelabspaltung aus dem Glutathion. Sie geht aus von der bekannten Tatsache, daß der an organische Verbindungen locker gebundene Schwefel durch Kochen der Substanz mit starker Lauge und etwas gesättigter Bleiacetatlösung an der Schwefelbleibildung qualitativ nachweisbar ist. Diese qualitative Reaktion läßt sich zu einer quan-

titativen Nachweismethode für die Sulfhydrylgruppe gestalten, wenn den eiweißfreien Lösungen eine Spur Platinschwamm als Katalysator zugesetzt wird. (C. Moncorps und R. Schmidt 23) Die Bestimmung erfolgt gravimetrisch als $BaSO_4$ oder bei geringen Mengen nephelometrisch. Die wohl am meisten geübte Methode ist die jodometrische Titration, welche von Tunnicliffe 24), Perlzweig-Delure 25), E. Gabbe 26) und King-Baumgartner und Page 27) angegeben wurde. Die in dieser Gruppe mitgeteilten Methoden haben alle gemeinsam, daß man das Jodbindungsvermögen der enteiweißten Filtrate bestimmt. Die Sulfhydrylform wird in die Disulfidform übergeführt und der reagierende Jodanteil zu Jodwasserstoff reduziert. Die von Tunnicliffe ausgearbeitete Methode hat man wieder verlassen, weil sie zu hohe Werte liefert. Perlzweig-Delure und King-Baumgartner und Page benutzten bei der Titration einen Jodüberschuß, welcher nach bestimmter Einwirkungsdauer mit Thiosulfat und Stärke als Indikator zurücktitriert wurde. Gabbe verwendete zur Oxydation des Glutathions Ferricyankaliumlösung ebenfalls im Überschuß und titrierte nach Zusatz von Zinksulfatkaliumjodidkochsalzlösung mit Thiosulfat zurück. Ein wesentlicher Unterschied bei diesen Methoden liegt in der Art der Enteiweißung und der dadurch gebildeten Wasserstoffionenkonzentration (Wolframsäure, Trichloressigsäure).

Veranlaßt durch die theoretisch exakten Ergebnisse der oben dargelegten Cysteinbestimmungsmethode verwendete ich diese Methode auch zu Glutathionbestimmungen, welche ich bisher durch Titration mit $\frac{n}{100}$ Jodlösung ausgeführt hatte. Nach einer großen Anzahl von Parallelbestimmungen mit beiden Methoden kann ich sagen, daß die Titration mit KJO_3 Lösung vorzuziehen ist. Man erhält nämlich Werte, an welchen keinerlei Korrektur anzubringen ist, wie bei der Titration mit Jodlösung. Der Endpunkt der Titration ist schärfer, während man bei der Benutzung der Jodlösung manchmal darüber im Zweifel sein kann. Die erhaltenen Glutathionwerte liegen etwas unter den mit Jodlösung gefundenen Werten, was für die neue Methode spricht, da es bekannt ist, daß die Jodlösung etwas zu hohe Werte liefert. Ein weiterer, wenn auch geringer Vorzug liegt in der besseren Haltbarkeit der KJO_3 Lösung. Es folgen einige Glutathionbestimmungen nach beiden Methoden:

Bei der Titration verbrauchte Lösungen in ccm.

$\frac{n}{100}$ Jodlösung ohne Korrektur	0,60	0,64	0,40	0,42	0,45	0,44	0,34	0,29
$\frac{n}{100}$ Jodlösung nach Korrektur	0,50	0,54	0,60	0,32	0,35	0,34	0,24	0,19
$\frac{n}{600}$ KJO_3Lösung	0,48	0,53	0,25	0,30	0,31	0,29	0,20	0,17

Die Einzelbestimmung führt man folgendermaßen aus: 3 ccm Blut läßt man in ein kleines Kölbchen einfließen, welches mit 10 ccm 1%iger Trichloressigsäure beschickt ist, und läßt 5 Min. lang hämolysieren. Hierauf werden unter Rühren 3 ccm 30%ige Trichloressigsäure hinzugegeben, wobei das Bluteiweiß kaguliert. Der Niederschlag wird des öfteren durchgerührt und nach dem Absitzenlassen durch einen möglichst kleinen Trichter (Faltenfilter 7 cm Durchmesser) filtriert und mit 3 x 5 ccm 10%iger Trichloressigsäure ausgewaschen. Jede Portion wird beim Waschen einmal untergeteilt, sodaß der Niederschlag sechsmal mit der Trichloressigsäure in Berührung kommt. Zu dem klaren Filtrate werden 2 ccm 4%ige Salzsäure, 3 ccm 0,5%ige Jodkaliumlösung und 2 Tropfen 3%ige Stärkelösung, die nicht trübe sein darf, hinzugesetzt. Die Titration erfolgt mit $\frac{n}{600}$ KJO_3 Lösung mittels Mikrobürette, bis die rein weiße Farbe des Filtrates in blau-violett umschlägt. $\frac{n}{600}$ KJO_3 Lösung wurde deshalb gewählt, weil $\frac{n}{100}$ KJO_3 Lösung verglichen mit $\frac{n}{100}$ Jodlösung nach der obenstehenden Berechnung eine sechsmal so starke Lösung darstellt, durch deren Gebrauch eine zu große Fehlerquelle entstünde. Aus den verbrauchten ccm der $\frac{n}{600}$ KJO_3 Lösung läßt sich die Glutathionmenge wie folgt errechnen.

Beispiel: 3 ccm Blut haben 0,545 ccm $\frac{n}{600}$ KJO_3 Lösung verbraucht. Dieser Wert ist durch die eingewogene Menge Blut zu dividieren und mit 307,25, dem Aequivalentgewicht des Glutathions zu multiplizieren. Man erhält so den Glutathiongehalt von 100 ccm Blut in mg Glutathion.

$$\frac{0{,}545 \cdot 307{,}25}{3{,}0494} = 54{,}90 \text{ mg pro 100 ccm Blut.}$$

Der Begriff Glutathion müßte eigentlich eine gewisse Einschränkung erfahren, da man ja nicht das Glutathion selbst, sondern das Jodbindungsvermögen des Trichloressigsäurefiltrates bestimmt. Ich lasse es jedoch bei der alten Definition bewenden, bin mir aber dabei über die Tatsache, daß ich auch andere jodbindende Stoffe bei der Titration miterfassen könnte, im klaren. In Besonderheit wäre in diesem Zusammenhange an den „irreversilben" Glutathionanteil zu denken.

Zusammenfassung.

1.) In Analogie zur Sauerstoffdissoziationskurve des Oxyhämoglobins wird das Verhalten des Glutathions im Blute unter steigenden und fallenden Sauerstoff-Partialdrucken geprüft und eine Bestätigung der bereits von Litarczek erkannten reversiblen Abhängigkeitsverhältnisse in dem relativ engen Sauerstoffspannungsbereich von 25—50 mm Hg gefunden.

2.) Ausgehend von der Erkenntnis, daß von der insgesamt im Blute nachweisbaren Glutathionmenge nur der Anteil, welcher die reversible Abhängigkeit von der Sauerstoffspannung zeigt, für die Oxydationsvorgänge im menschlichen Organismus eine Bedeutung haben könnte, wird der Glutathionbestand des Blutes in einen „reversiblen" und einen „irreversiblen" Anteil getrennt und der Gehalt des Blutes an reversiblem Glutathion bei zahlreichen gesunden und kranken Menschen ermittelt. Dabei wurde bei gesunden Menschen durchschnittlich ein reversibler Glutathiongehalt von 20% des Gesamtgehaltes gefunden. Die gleiche zahlenmäßige Beziehung fand sich bei Patienten, deren Leiden keinen vermehrten Sauerstoffverbrauch erwarten ließen. Im Gegensatz hierzu wurde bei solchen Krankheiten, in deren Verlauf ein gesteigerter Sauerstoffverbrauch bezw. ein Sauerstoffmangel an der Peripherie herrschte, eine erhebliche Vermehrung des reversiblen Glutathionanteils festgestellt (Basedow, Herzdekompensation, Co-Vergiftung).

3.) Aus einem Modellversuch mit Cystein, dem wesentlichsten Bestandteile des Glutathions ging hervor, daß das Cystein auch unter möglichst physiologischen Bedingungen im Gegensatz zum Glutathion eine Abhängigkeit von der Sauerstoffspannung im Sinne einer reversiblen Oxydation nicht zeigte. Bei der Beobachtung der Autoxydation des Cysteins wurde eine deutliche Empfindlichkeit gegenüber der Wasserstoffionenkonzentration festgestellt und zwar bei Verschiebung nach der alkalischen Seite im Sinne einer Beschleunigung der Oxydation.

Hiermit möchte ich Herrn Direktor Priv.-Doz. Dr. med. H. W. Bansi für die freundliche Überlassung des Themas und liebenswürdigen Rat, Herrn Dr. M. Rohrlich für die freundliche Mitarbeit und Herrn Prof. Dr. med. Siebeck für das Referat meinen Dank aussprechen.

Literaturangaben.

1.) **De Ray-Pailhade.** Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. 1888 106, 107.
2.) **A. Hefter.** Med.-naturwissenschaftl. Arch. 1, 81 (1908).
3.) **Hopkins.** Biochemic. J. 15, 286 (1921). J. of Biol. Chem. 84, 269 (1929).
4.) **Hunter u. Eagles.** J. of Biol. Chem. 72, 147 (1927).
5.) **Kendall u. Mason.** Amer. Jl. Phys. 90, 409 (1929).
6.) **Graßmann, Dyckerhoff u. Eibeler.** Hoppe-Seylers Z. 169, 112 (1930).
7.) **Kendall c. s.** Jl. of Biol. Chem. 87, 55; 88, 409 (1930).
8.) **Kamya Tokuo.** Nagoya. J. med. Sci. 3. (1928).
9.) **E. Abderhalden u. W. Geidel.** Fermentforschung 13, 97 (1931).
10.) **Pringsheim.** Biochem. Z. 138, 476 (1931).
11.) **Blanchetière.** J. Physiol. et Path. gén. 28, 816—821 (1930).
12.) **A. Giroud et H. Bulliard,** Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 98 Nr. 7 S. 500 (1928).
13.) **C. Voegtlin.** U. S. Public. Health Reports. 860, 32 (1923).
14.) **Takuwa Manao.** Mitt. med. Akad. Kioto. 3 (1929).
15.) **E. Gabbe.** Verh. physik.-med. Ges. Würzburg. 53, 98—101 (1928). Kli. Wo. 1929 S. 2077.
16.) **Blanchetière, Léon Binet et L. Melon.** Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 97 Nr. 27 (1927).
17.) **Anselmino.** Arch. d. Gynaecolog. 143 (1931).
18.) **Delrue,** G. u. A. Fischer. C. r. Soc. Biol. Paris 113, 942—944 (1933).
19.) **Litarczek.** C. R. Soc. Biol. Paris 108, 343—349 (1931).
20.) **Y. Okuda.** Chem. Zentr.Bl. 1926 I 1462; Chem. Zentr.Bl. 1929 II 2904.
21.) **Folin u. Loony.** J. of Biol. Chem. 51, 171, 427 (1921).
22.) **Hunter u. Eagles.** J. of Biol. Chem. 72, 177 (1927).
23.) **C. Moncorps u. R. Schmidt.** Zeitschr. f. physiol. Chemie 205, 141 (1932).
24.) **Tunnicliffe.** Biochemic. J. 19, 194 (1925).
25.) **Perlzweig-Delure.** Biochemic. J. 21, 146 (1927).
26.) **Gabbe.** Kli.Wo. 1929 Nr. 45 1930 Nr. 4.
27.) **King-Baumgartner-Page.** Biochem. Z. 217, 389 (1930).

Lebenslauf.

Am 22. Januar 1905 wurde ich als Sohn des Materialienverwalters Viktor Kalinke zu Königshütte (Oberschles.) geboren. Ich bin evang. Konfession und habe in Königshütte das humanistische Gymnasium besucht. Ostern 1924 legte ich daselbst die Reifeprüfung ab. Herbst 1924—1926 war ich als Praktikant, Herbst 1926 bis 1927 als Apothekerassistent in verschiedenen Apotheken tätig. Im Herbst 1927 begann ich mein Studium an der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin, Herbst 1929 bestand ich daselbst das pharmazeutische, und am 30. I. 34 das medizinische Staatsexamen. Augenblicklich bin ich am Städt. Krankenhaus am Urban als Medizinal-Praktikant tätig.

Martin Kalinke.